

**L'HÉMAGGLUTININE
DU VIRUS
DES OREILLONS**
(Etude comparée de 8 souches)

Travail du Laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine de Lyon
(Professeur R. SOHIER)

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 24 NOVEMBRE 1955

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

par

FAVIER Gustave

Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire
Certifié de Physiologie générale et de Chimie biologique
Diplômé de Sérologie.

Né le 3 Avril 1929 à CHANTELLE (Allier)



IMPRIMERIE DES BEAUX-ARTS
CAMILLE ANNEQUIN, 19, RUE ROUX-SOIGNAT, LYON

—
1955

L'HÉMAGGLUTININE DU VIRUS DES OREILLONS

ÉTUDE COMPARÉE DE 8 SOUCHES

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Doyen Honoraire.....	MM. J. LEPINE
Doyen	H. HERMANN
Assesseur	J. GATE

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. NICOLAS, COLLET, CLUZET, BERARD, GUIART, PIERY, CADE, PATEL, LEPINE,
SAVY, TRILLAT, LERICHE, MOURIQUAND, MAZEL, LEULIER, GARIN

PROFESSEURS

Clinique médicale A.....	MM. FROMENT
Clinique médicale B.....	P. RAVAUULT
Clinique chirurgicale A.....	SANTY
Clinique chirurgicale B.....	WERTHEIMER
Clinique ophtalmologique.....	BONNET
Clinique urologique.....	CIBERT
Clinique et prophylaxie de la tuberculose.....	DUFOURT
Clinique dermatologique et syphiligraphique.....	GATE
Clinique neuro-psychiatrique et Hygiène mentale.....	DECHAUME
Clinique des maladies infectieuses et bactériologie.....	SEDALLIAN
Clinique de chirurgie orthopédique et chirurgie infantile.....	GUILLEMINET
Clinique gynécologique.....	POLLOSSON
Clinique obstétricale.....	PIGEAUD
Clinique stomatologique.....	DUCLOS
Clinique médicale infantile et Hygiène premier âge.....	BERNHEIM
Clinique oto-rhino-laryngologie.....	MAYOUX
Physiologie.....	HERMANN
Anatomie pathologique.....	J.-F. MARTIN
Physique biologique, Radiologie et Physiothérapie.....	PONTHUS dét. à Beyrouth
Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire.....	ROCHET
Chimie organique et Toxicologie.....	CHAMBRON
Pathologie générale et expérimentale.....	JOSSERAND
Hydrologie thérapeutique, Climatologie et Ecologie sociale.....	DELORE
Anatomie.....	GABRIELLE
Pathologie interne.....	CROIZAT
Chimie biologique et médicale.....	ENSELME
Pathologie chirurgicale.....	MALLET-GUY
Histologie.....	NOEL
Pharmacie galénique et matière médicale.....	REVOL
Médecine du Travail.....	BOURRET
Thérapeutique.....	LEVRAT
Hygiène et Action sanitaire et sociale.....	SOHIER
Biologie médicale et pharmacodynamie.....	JOURDAN
Botanique et cryptogamie.....	NETIEN
Propédeutique chirurgicale.....	BERTRAND
Chimie analytique pharmaceutique.....	BADINARD
Pharmacie et Pharmacologie.....	DREVON
Médecine légale et déontologie.....	ROCHE
Parasitologie et Pathologie exotique.....	X...

PROFESSEURS TITULAIRES SANS CHAIRE

Obstétrique.....	MM. BANSSILLON
Physique biologique.....	BERGER

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS

Parasitologie.....	MM. ROMAN	Ph. galén. et mat. méd.	MM. DORCHE
Parasitologie.....	COUDERT	Anatomie.....	DUROUX
Physiologie.....	J.-F. CIER	Pharm. et pharmacolog.	A. CIER
Physiologie.....	CHATONNET	Hygiène.....	BENAZET
Chimie biol. et médic.	R. CREYSSSEL	Anatomie pathologique.	FEROLDI
Bactériologie.....	A. BERTOYE	Chim. organ. et toxicol.	PERROT

AGRÉGÉS EN EXERCICE

Pathologie médicale....	MM. GALY	Ophtalmologie.....	MM. PAUFIQUE
Pathologie médicale....	GONIN	Obstétrique.....	MAGNIN
Pathologie médicale....	GUINET	Obstétrique.....	J. MATHIEU
Pathologie médicale....	PONT	Obstétrique.....	BURTHIAULT
Pathologie médicale....	VIGNON	Oto-rhino-laryngologie..	GIGNOUX
Pathologie médicale....	REVOL	Dermato-vénérologie..	THIERS
Pathologie médicale....	TRAEGER	Urologie.....	PERRIN
Pathologie chirurgicale..	MANSUY	Neuro-chirurgie.....	LEQUIRE
Pathologie chirurgicale..	DARGENT	Orthopédie.....	J. MARION
Pathologie chirurgicale..	GUILLET	Stomatologie.....	FREIDEL
Pathologie chirurgicale..	P. MARION	Electro-radiologie.....	PAPILLON
Pathologie chirurgicale..	MICHAUD	Pédiatrie et puériculture	FRANÇOIS
Pathologie chirurgicale..	JAUBERT DE BEAUJEU	Thérapeutique.....	BRETTE
Pathologie chirurgicale..	SAUTOT	Maladies infectieuses...	MONNET

CHARGÉ DES FONCTIONS D'AGRÉGÉ

Médecine légale.....	M. COLIN
----------------------	----------

CHARGÉS DES FONCTIONS DE MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS

Histologie.....	MM. L. DUMONT
Physique biologique.....	MORET

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM. SOHIER, Président ; GALY, BENAZET, FRANÇOIS, Assesseurs.

La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

**L'HÉMAGGLUTININE
DU VIRUS
DES OREILLONS
(Etude comparée de 8 souches)**

Travail du Laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine de Lyon
(Professeur R. SOHIER)

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 24 NOVEMBRE 1955

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

par

FAVIER Gustave

Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire
Certifié de Physiologie générale et de Chimie biologique
Diplômé de Sérologie

Né le 3 Avril 1929 à CHANTELLE (Allier)



IMPRIMERIE DES BEAUX-ARTS
CAMILLE ANNEQUIN, 19, RUE ROUX-SOIGNAT, LYON

—
1955



A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A MA MÈRE

Je lui dois tout.

En témoignage de ma reconnaissance et de
mon affection.

A MA FEMME

Toute ma tendresse.

A MON FRÈRE

A MON PARRAIN ET SON ÉPOUSE

A TOUS LES MIENS

A NOTRE MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

Monsieur le Professeur SOHIER

Professeur d'Hygiène

Professeur Agrégé du Val-de-Grâce

Membre Correspondant de l'Académie de Médecine

Pendant deux années nous avons eu le privilège de travailler à ses côtés et de bénéficier de son enseignement si riche et si attachant tant à l'hôpital qu'au laboratoire.

Il a eu l'idée de ce travail et nous a guidé tout au long de nos recherches.

Nous lui sommes infiniment reconnaissant de l'intérêt qu'il nous a témoigné.

Qu'il nous soit permis de lui exprimer notre gratitude et notre profond attachement.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur Agrégé GALY

Hommages respectueux.

Monsieur le Professeur Agrégé BÉNAZET

L'étendue de ses connaissances, la précision de son enseignement, son extrême affabilité nous font un agréable devoir de lui exprimer notre admiration et le plaisir que nous avons eu à travailler dans son laboratoire.

Monsieur le Professeur Agrégé FRANÇOIS

Hommages respectueux.

A Monsieur le Docteur COUTURE

Docteur ès Sciences

Il nous a toujours accueilli avec son bienveillant sourire.

A Mademoiselle le Docteur PEILLARD

Licenciée ès Sciences

Nous lui savons gré de nous avoir initié à la sérologie.

Au Médecin-Lieutenant GINESTE

Il fut le meilleur des compagnons pendant deux années de travail en commun au Laboratoire d'Hygiène.

A Mesdemoiselles CHALLUT et CHARDONNET

Elles ont mené à bien avec maîtrise et précision les ovocultures et l'épreuve de neutralisation. Nous les remercions pour leur précieuse collaboration.

AUX COLLABORATRICES ET AUX COLLABORATEURS
DU LABORATOIRE D'HYGIÈNE

A Monsieur le Médecin-Général GIRAUD

Professeur Agrégé du Val-de-Grâce

Directeur de l'Ecole du Service de Santé Militaire
et de l'Hôpital Militaire d'Instruction Des Genettes

A NOS MAITRES DE LA FACULTÉ, DES HOPITAUX CIVILS
ET DE L'HOPITAL MILITAIRE DES GENETTES

A MESSIEURS LES INTERNES
DU SERVICE DES CONTAGIEUX ET DU LABORATOIRE
DE L'HOPITAL DES GENETTES

A TOUS MES CAMARADES

INTRODUCTION

On sait que de nombreux problèmes concernant les infections à virus et en particulier leur immunologie sont simplifiés ou compliqués selon que le virus en cause a un seul ou plusieurs types antigéniques. Réalisant les premiers l'immunisation expérimentale contre les maladies à virus, Pasteur et Jenner ont eu la chance de se trouver devant des virus ayant un seul type antigénique. Il y a lieu de noter que les vaccinations qui à ce jour se sont montrées efficaces (vaccine, rage, fièvre jaune) ont été effectuées avec des virus vivants et se comportant, du moins quant à leur efficacité, comme s'il existait un seul type antigénique. A l'opposé, on connaît la difficulté rencontrée pour la vaccination contre la grippe et la poliomyélite, difficulté liée en partie à l'existence de plusieurs types antigéniques.

La question se trouve posée de savoir s'il existe pour chacun des virus actuellement connus un ou plusieurs types antigéniques. Parmi les viroses pour lesquelles on semble admettre qu'il n'existe qu'un seul type figurent les oreillons. Cette unicité des souches a été basée jusqu'ici sur des données épidémiologiques empiriques. En effet, on admet qu'un sujet qui a contracté les oreillons est immunisé pour le reste de sa vie. En outre, les recherches effectuées à ce jour au laboratoire laissent à penser qu'il n'y a qu'un seul type de virus ourlien.

Toutefois on trouve, cité par Hannoun (1951), le fait que Wolf aurait isolé aux Pays-Bas une souche différente de la souche Enders.

Il a paru intéressant à M. le Professeur Sohier, qui nous a confié une partie de ce travail, de reprendre l'étude comparée de plu-

sieurs souches de virus ourlien quant à leurs diverses propriétés biologiques, en particulier leur conservation, leur hémagglutinine, leur aptitude à provoquer l'immunité, enfin leurs caractères antigéniques jugés par d'autres procédés.

En ce qui concerne l'étude de l'hémagglutinine ourlienne deux faits avaient retenu l'attention du Professeur Sohier. Le premier concerne la conservation que plusieurs auteurs estimaient être courte alors que d'autres (Cabasso 1951, Sohier et Esser 1952 b) la considéraient assez longue, du moins pour certaines souches. Le deuxième est relatif au comportement différent de certaines souches en présence d'hématies provenant de diverses espèces animales, fait signalé par Cabasso (1955) et qui a fait l'objet d'une publication récente.

Cette étude présente à nos yeux l'intérêt suivant :

Intérêt diagnostique. — La connaissance d'un pouvoir agglutinant différent selon la variété d'hématies utilisée doit permettre d'éviter des erreurs. Il peut être dangereux, en effet, d'utiliser indifféremment, comme on l'a proposé jusqu'alors, des hématies de poule, cobaye, mouton ou homme alors que certaines souches de virus ourlien semblent avoir un pouvoir agglutinant très faible voire même nul pour certaines hématies dans certaines conditions.

Cet intérêt diagnostique se double d'un intérêt biologique général dans le domaine de l'hémagglutination virale.

Intérêt immunologique. — La recherche de l'unicité ou de la pluralité des souches du virus ourlien peut avoir des conséquences tant en immunisation passive que pour la vaccination.

On sait, en effet, en ce qui concerne l'immunisation passive, que les résultats satisfaisants ont été obtenus seulement avec du sérum de convalescent ou des gamma-globulines recueillies in situ et utilisées en cours d'épidémie alors que pour d'autres viro-ses (rougeole, poliomyélite) on a obtenu des résultats avec du sérum ou des gamma-globulines « tout venant ». On peut se

demander si n'interviennent pas pour les oreillons les facteurs liés aux propriétés antigéniques du virus en cause.

En ce qui concerne l'immunisation active on doit noter que certains malades affirment avoir eu deux fois les oreillons, bien qu'il soit difficile d'affirmer cette réinfection, le même médecin n'ayant habituellement pas constaté la récurrence.

Quant à la vaccination, on sait que les résultats ne sont ni constants ni totaux, il existe des échecs.

CHAPITRE PREMIER

ISOLEMENT DU VIRUS OURLIEN LES SOUCHES ÉTUDIÉES

A) LES SOUCHES PROVENANT DE DIFFÉRENTS LABORATOIRES

Souche Enders.

Souche isolée par inoculation à l'œuf embryonné d'une émulsion saline de parotide de singe infecté par le virus ourlien (Levens et Enders, Science, 1945).

La souche Enders étudiée dans ce travail a été remise au Laboratoire d'Hygiène par MM. Cox et Cabasso, de la "Section of Viral and Rickettsial Research, Lederle Laboratories Division".

Il s'agissait d'un liquide allantoïque (recueilli en septembre 1949) en ampoule lyophilisée qui a été conservé au Laboratoire d'Hygiène à — 20° jusqu'à son inoculation en mars 1955.

Souche L.K.

Souche isolée en 1949 chez un malade présentant une parotidite ourlienne.

Souche Gunst.

Souche isolée en 1952 du liquide céphalo-rachidien d'un malade présentant une méningo-encéphalite ourlienne.

Les souches L.K. et Gunst ont été remises au Laboratoire d'Hygiène par le Docteur Wolf, du Laboratoire d'Hygiène tropicale de l'Université de Leiden (Pays-Bas). Ces souches reçues en ampoules lyophilisées ont été cultivées selon la technique du Laboratoire d'Hygiène (Sohier et Esser 1952, a).

B) SOUCHES ISOLÉES AU LABORATOIRE D'HYGIÈNE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE LYON

MÉTHODE D'ISOLEMENT

Les souches ont été isolées au Laboratoire d'Hygiène à partir de la salive parotidienne de malades atteints de parotidite ourlienne ou à partir du liquide céphalo-rachidien provenant d'un malade atteint de méningite ourlienne.

I. — Prélèvement des produits à inoculer.

a) Date du prélèvement.

Les données épidémiologiques et surtout les précisions apportées par les méthodes d'inoculation au singe et à l'œuf embryonné ont permis de préciser les délais opportuns des différents prélèvements en vue de l'inoculation.

— **Salive.** Il convient de la prélever le plus tôt possible, au plus tard le cinquième jour de la maladie. Il serait d'ailleurs préférable de recueillir la salive dès la période d'invasion (ce qui est possible dans une collectivité où sévit une épidémie). En effet, des précisions importantes sur la présence du virus dans la salive aux différents stades de l'infection ont été apportées par Henle (1948). On doit noter que le virus a pu être trouvé au cours d'une orchite primitive alors que les parotides n'étaient pas atteintes, de même au cours d'une méningite sans lésion parotidienne.

— **Liquide céphalo-rachidien.** Il paraît souhaitable d'effectuer le prélèvement du deuxième au sixième jour, mais de préférence les deux premiers jours après le début des signes cliniques de méningo-encéphalite ourlienne selon les précisions données par Kilham (1949).

Dans les formes à localisation purement glandulaire cet auteur a vérifié l'inoculation de six liquides céphalo-rachidiens sans obtenir aucun résultat positif au cours de trois passages successifs.

Il faut noter la nécessité d'une modification cytologique du liquide céphalo-rachidien pour obtenir le virus lors de l'inoculation à l'œuf embryonné.

b) Mode de prélèvement.

— **Salive.** Plutôt qu'à la salive totale on s'adresse à la salive parotidienne recueillie à l'aide du sialopréleveur proposé par Sohier et Nabonne (1939). Il consiste essentiellement en une cupule appliquée autour de l'orifice du canal de Sténon et maintenue en place par une légère dépression ou pression (voir Lépine et Sohier, 1954, p. 267).

Après lavage de la bouche à l'eau physiologique et application autour du canal de Sténon d'alcool iodé à 1 % qu'on laisse sécher, on applique l'appareil après avoir rassuré le malade (l'émotion pouvant tarir la sécrétion). On stimule la sécrétion en déposant sur la langue un peu de jus de citron et on recueille la salive dans l'appareil. 3 à 4 ml sont nécessaires pour l'inoculation à l'œuf embryonné. On doit savoir qu'au début de la parotidite ourlienne il est parfois impossible d'obtenir de la salive mais tout au plus 2 à 3 gouttes d'un liquide épais blanchâtre.

— **Liquide céphalo-rachidien.** On prélève par ponction lombaire 5 à 10 ml de liquide céphalo-rachidien le plus stérilement possible.

c) Conservation des produits avant inoculation.

Dès le prélèvement effectué (salive ou liquide céphalo-rachidien) on congèle celui-ci à -20° , ce qui permet une conservation de plusieurs semaines. La lyophilisation permet une conservation de plusieurs mois.

II. — Isolement par inoculation à l'œuf embryonné.

Il semble qu'au sortir de l'organisme le virus ourlien ne puisse se développer que dans la cavité amniotique ou dans le sac vitellin. Il faut donc inoculer les produits pathologiques dans l'amnios. Cette servitude peut être gênante car l'inoculation intra-amniotique est délicate.

a) Préparation des produits inoculés.

Elle a pour but d'éliminer les microorganismes figurés.

Pour la salive totale on procède à une centrifugation, à 3.000 tours pendant 15 minutes puis on ajoute 1.000 U.O. de pénicilline et 100 gamma de streptomycine par ml. (Leymaster et Ward, 1947).

Pour la salive parotidienne, obtenue stérilement avec le sialo-préleveur, la centrifugation n'est pas pratiquée mais par sécurité on ajoute les antibiotiques comme ci-dessus.

Il est nécessaire de diluer la salive au 1/2 dans du bouillon ordinaire pour diminuer la mortalité non spécifique des embryons observée après injection de salive concentrée. Nous avons employé le bouillon :

Extrait de viande Difco.....	3 gr.
Peptone U.C.A.F.	20 gr.
ClNa	5 gr.
Eau distillée.....	1.000 ml.
pH ajusté à 7,4.	

b) Inoculation.

L'inoculation se fait par voie amniotique selon la technique de Sohier et Esser (1952, a) sur des œufs incubés 7 jours à 39°.

Technique du Laboratoire d'Hygiène.

Les œufs sont placés verticalement sur un support type coquetier (dans la position d'incubation). Un mirage convenable est réalisé par une lampe orientable comportant une source lumineuse punctiforme et un système optique donnant un faisceau de rayons parallèles (type de lampe pour microscope à fond noir). Sur cette lampe est placée une lame de carton assez souple et venant s'appuyer au moment de l'examen de l'œuf sur son pôle supérieur pour dissimuler une partie du faisceau lumineux. On voit apparaître nettement pour la plupart des œufs les divers détails et repères. On peut d'ailleurs les voir mieux en plaçant les deux mains de chaque côté de l'œuf, les paumes tournées vers la source de lumière ou avec un carton percé d'une fenêtre ovale mise devant l'œuf.

Après repérage soigneux de l'embryon, une aiguille à extrémité fine montée sur une seringue contenant le liquide à inoculer est enfoncée d'un coup sec dans la direction de l'embryon. Au moment où elle pénètre dans le sac, l'embryon effectue un mouvement de recul. On retire alors légèrement l'aiguille et on injecte. On obture à la cellophane adhésive.

Les avantages de cette méthode sont les suivants : simplicité, sécurité très grande, absence de lésion ou de souillure, possibilité de procéder aux inoculations en série et de faire alternativement des inoculations amniotiques et allantoïques.

La seule objection serait la mauvaise visibilité de l'embryon. Mais on peut trier les œufs au préalable et ne conserver pour l'inoculation amniotique que ceux qui ont un embryon bien repéré.

On inocule 5 œufs au moins, 10 de préférence, avec 2 ml. de la dilution au 1/2 en bouillon ordinaire. Les œufs inoculés sont soumis à une seconde incubation à 35° pendant 5 à 6 jours.

c) Prélèvement des liquides.

Pendant la seconde incubation on effectue un mirage quotidien des œufs. On peut trouver au premier passage une forte mortalité. On élimine les morts des premières 48 heures ; mais à partir de ce délai on contrôle le pouvoir hémagglutinant des liquides de ces œufs morts. Avant de procéder à la récolte des liquides on place les œufs une nuit au réfrigérateur pour diminuer les risques d'hémorragie.

Technique du Laboratoire d'Hygiène.

Après désinfection de la coquille avec de l'alcool iodé (30 %) on enlève la calotte recouvrant la chambre à air en coupant un petit cercle avec des ciseaux courbes. Une goutte d'alcool rend la membrane transparente et permet de localiser l'embryon. Après repérage d'un point dépourvu de grands vaisseaux du côté de l'œil de l'embryon, on chauffe au rouge l'extrémité d'une petite pince pointue, et on brûle un petit orifice. Il faut juste toucher sans enfoncer pour ne pas léser le sac amniotique sous-jacent. Ce procédé élimine le risque d'hémorragie par coagulation des vaisseaux éventuellement touchés. A travers la petite fente ainsi pratiquée, on peut aisément glisser une pipette à boule dont l'extrémité mousse est bouchée et qui comporte un petit orifice latéral. En appuyant sur l'embryon on oriente l'orifice du côté de la paroi de l'œuf pour éviter que le sac amniotique ne soit aspiré et ne bouche la pipette. On aspire le liquide et on le met en tubes. Après aspiration du liquide allantoïque on peut agrandir la fente. Une fine pince à griffes sert à soulever le sac amniotique. A l'aide du bout de la pipette, on fore une petite fente, on glisse la pipette à l'intérieur du sac (l'orifice latéral est dirigé vers l'embryon) avec des mouvements qui semblent râcler la surface, on exerce une aspiration et on obtient facilement le liquide amniotique.

La quantité de liquide allantoïque varie généralement entre 2 et 8 ml, celle du liquide amniotique entre 0,5 et 3 ml.

On peut constater l'absence d'un des deux liquides. La souche V. C. R. a la particularité de présenter souvent des amnios énormes avec une absence presque complète de liquide allantoïque.

Un liquide non infecté est parfaitement clair. Une légère opalescence est un signe d'infection virale, elle disparaît après centrifugation (20.000 t/min.). En présence de liquides réellement troubles il faut se méfier d'une contamination bactérienne, surtout pour le liquide amniotique.

Les liquides recueillis sont immédiatement soumis à un contrôle de stérilité sur le milieu de Bonnel (1950) qui permet la culture des germes en Aérobiose et Anaérobiose.

Bouillon peptoné ou bouillon Liebig.	1.000 ml
Gélose	1,70 gr.
Hydrosulfite de soude.....	3 gr.
Glucose	5,50 gr.
Sol. 1 % de bleu de méthylène....	XIV gouttes

Chaque liquide prélevé est soumis à une épreuve de « dégrossissage » sur plaque, quant à son pouvoir hémagglutinant. Trois gouttes de liquide sont mises en contact avec une goutte d'hématies de poule en suspension 1 % en tampon Salk. On apprécie

l'héماغglutination spontanée et après rotation sur l'appareil d'Himmelweit (1949). Les liquides héماغglutinants sont ensuite soumis à un titrage définitif, selon la technique en tubes que nous détaillerons plus loin.

d) Passages.

Lors de la première récolte on peut déjà observer le phénomène d'héماغglutination, le taux pouvant aller jusqu'au 1/160 (souche Chopin). Mais il se peut que le liquide ne produise pas l'agglutination des hématies bien que le virus soit présent.

Par le même procédé on fait de nouvelles inoculations avec le liquide amniotique prélevé puis congelé à -20° en attendant l'inoculation. On peut, notamment avec le liquide céphalo-rachidien, n'observer d'héماغglutination qu'après le deuxième ou le troisième passage. Si après le troisième passage on n'obtient pas de liquides héماغglutinants on peut considérer que l'isolement a échoué.

Pour adapter le virus à la culture en liquide allantoïque il faut un plus grand nombre de passages (parfois 15 ou 20 et plus).

SOUCHES ISOLÉES AU LABORATOIRE D'HYGIÈNE

Souche B.O.S.

Isolée en février 1952 à partir de la salive parotidienne prélevée au sialopréleveur le deuxième jour de la maladie chez un malade présentant une parotidite.

- Nette héماغglutination au premier passage (1/40).
- Adaptation à la cavité allantoïque au quatorzième passage.

Souche Chopin.

Isolée à partir de la salive parotidienne prélevée le premier jour de la maladie chez un malade présentant une tuméfaction parotidienne unilatérale très discrète.

Conservation de la salive à -20° pendant quatre jours avant l'inoculation.

- Nette héماغglutination au premier passage (1/160).

— L'hémagglutinine étudiée dans ce travail a été recueillie lors du seizième passage.

Souche V.C.R.

— Isolée en mars 1951 à partir du liquide céphalo-rachidien prélevé au troisième jour de la maladie chez un malade atteint de méningite ourlienne.

— Conservation 4 semaines à — 20° avant l'inoculation.

— Hémagglutination faible au premier passage, nette au deuxième.

— Adaptation à la cavité allantoïque au quatrième passage.

Souche Witzke.

— Isolée en janvier 1954 à partir de la salive parotidienne prélevée au sialopréleveur le troisième jour de la maladie chez un malade présentant une parotidite ourlienne.

— Conservation pendant 10 jours à — 20° avant l'inoculation.

— Hémagglutination au deuxième passage (1/160).

— L'hémagglutinine étudiée dans ce travail a été recueillie au septième passage.

Souche Pachoud.

— Isolée en octobre 1954 à partir de la salive parotidienne d'un malade atteint de parotidite ourlienne, prélevée au sialopréleveur le deuxième jour de la maladie.

— Conservation pendant 18 jours à — 20° avant l'inoculation.

— Hémagglutination dès le premier passage.

— Les hémagglutinines étudiées dans ce travail ont été recueillies au quatrième et au dixième passage.

CHAPITRE II

L'HÉMAGGLUTININE OURLIENNE : SA CONSERVATION

A) L'HÉMAGGLUTININE OURLIENNE

Depuis les travaux de Levens et Enders (1945), de Beveridge et Lind (1946), de Beveridge, Lind et Anderson (1946), de Burnet (1946), de G. Henle, W. Henle et Harris (1947), de Weil et Beard (1948) et de Ginsberg, Goebel et Horshall (1948), on sait que l'inoculation dans l'œuf embryonné du virus ourlien fait apparaître un pouvoir hémagglutinant dans les liquides amniotiques et éventuellement allantoïques et à un degré moindre dans les extraits de membranes amniotiques et allantoïques ainsi que dans le liquide du sac vitellin.

L'hémagglutinine ourlienne est obtenue dans les liquides de l'œuf infecté : liquide amniotique, liquide allantoïque si le virus est adapté à cette cavité et aussi dans les suspensions de membranes, si une suspension de virus convenablement diluée est injectée dans une de ces cavités d'un œuf préalablement incubé, puis soumis à une seconde incubation. Ginsberg, Goebel, et Horsfall (1948) ont montré que les conditions optima sont une inoculation dans l'embryon de 7 jours puis une incubation à la température de 35° pendant 6 jours. L'hémagglutinine commence son évolution à partir du troisième jour d'incubation avec un maximum vers le sixième et le septième jour puis une baisse du titre.

Technique du Laboratoire d'Hygiène.

Les différentes hémagglutinines que nous avons étudiées dans ce travail ont été obtenues par inoculation à l'œuf embryonné des souches isolées au Laboratoire d'Hygiène ou provenant d'autres laboratoires.

L'inoculation se fait sur des œufs incubés à 39° pendant 7 jours. On récolte les liquides après une seconde incubation de 5 à 6 jours à 35°. (La technique d'inoculation et de prélèvement est celle décrite pour l'isolement des souches.) Le pouvoir hémagglutinant apparaît souvent dès le premier passage dans le liquide amniotique mais il faut un grand nombre de passages pour adapter la souche à la cavité allantoïque.

Il faut noter que le développement de l'hémagglutinine comporte d'assez grandes variations. Certaines souches bien adaptées, Enders, B.O.S., donnent des taux assez constants mais certaines autres donnent des variations d'une récolte à l'autre.

Ces variations sont fonction de la dose infectante qui ne doit pas être trop forte. De même que Hirst (1942), G. Henle et W. Henle (1943, 1946), ainsi que Vieuchange, Reinie et Sautter (1946) l'avaient montré pour le virus grippal, Ginsberg et ses collaborateurs (1948) ont montré qu'il existe une relation entre le taux d'hémagglutinine et la dose infectante 50 %. Ils ont démontré que l'hémagglutinine ourlienne n'est pas décelable par le phénomène d'agglutination avant que le titre infectieux 50 % ait atteint le taux de 10^{-4} , ce qu'on n'observe généralement pas avant le troisième jour d'incubation.

Ils ont pu établir le rapport entre le pouvoir infectant et le pouvoir hémagglutinant pour une large gamme de dilutions, l'unité de relation valable trouvée pour le virus ourlien est le facteur $10^{-4,6}$.

Au cours des inoculations de la souche V.C.R., Sohier et Esser (1952, b) ont observé de telles variations et ont utilisé des dilutions entre le 1/4.000.000 et le 1/10.000.000. En augmentant les dilutions ils sont arrivés à un plafond où, avec une infection encore élevée, le taux d'hémagglutinine commence à baisser.

Cependant, même avec des dilutions de virus apparemment convenables, il arrive que l'on obtienne des taux très variables

d'hémagglutinine selon les séries et sans qu'il soit possible de mettre en évidence une cause précise. Ce fait noté par de nombreux auteurs a été rappelé récemment par Gotlieb et ses Coll. (1953).

B) TECHNIQUES DE TITRAGE DE L'HÉMAGGLUTININE OURLIENNE

De nombreuses méthodes ont été proposées, elles diffèrent surtout par les proportions des différents éléments en présence et leur modalité de contact, par les conditions dans lesquelles le phénomène d'hémagglutination est provoqué (en tube ou sur plaque), par le procédé de lecture (à l'œil nu ou à l'aide d'appareils optiques divers).

On trouvera le détail de ces différentes techniques dans le livre de MM. Lépine et Sohier (1954), méthodes en tubes : Hirst, Burnet, Salk, Lépine, méthode sur plaques : Himmelweit.

La méthode de Salk souvent utilisée est celle employée par Cabasso (1951) dans ses différents travaux que nous allons citer plus loin. Elle consiste à répartir sous un volume de 0,5 ml. des dilutions croissantes de suspension d'hémagglutinine puis à ajouter dans chaque tube 0,5 ml. d'une suspension d'hématies à 0,25 %. La lecture se fait après sédimentation de une heure et demie à deux heures et demie selon l'origine des hématies. Cabasso utilise un mélange d'hématies provenant de 3 ou 4 animaux de même espèce.

Technique utilisée au Laboratoire d'Hygiène.

I. — Les hématies.

a) **Prélèvement** (dans chaque cas prélèvement stérile).

— **Hématies de poule.**

On ne procède pas à des saignées répétées chez une même poule pour éviter des phénomènes d'hémolyse. On s'adresse à des poules « tout venant » de race leghorn choisies au hasard chez un marchand.

Le sang obtenu par section de l'artère linguale s'écoule dans le flacon contenant la solution d'Alsever et il est mis au réfrigérateur dans les 15 minutes suivant le prélèvement. On sacrifie une poule au début de chaque semaine et les hématies sont utilisées au cours de cette même semaine.

— **Hématies de cobaye.**

On prélève par ponction cardiaque 10 ml. de sang qu'on met immédiatement dans la solution d'Alsever. On évite de rapprocher les saignées de moins de 20 jours et on utilise de préférence le même cobaye au cours des expériences.

— **Hématies de mouton.**

Le sang prélevé par ponction de la veine jugulaire est recueilli directement dans le flacon contenant la solution d'Alsever. On saigne le même mouton toutes les trois semaines environ.

— **Hématies humaines (groupe O).**

On prélève par ponction de la veine cubitale 20 ml. de sang qu'on met immédiatement dans le flacon contenant la solution d'Alsever. On fait un prélèvement toutes les trois ou quatre semaines chez le même donneur. Il faut respecter un intervalle d'au moins trois jours entre le prélèvement et l'utilisation.

b) **Conservation.**

Les hématies recueillies directement sur liquide d'Alsever ou mises dans ce liquide dès la ponction effectuée sont aussitôt placées au réfrigérateur à 4°.

— **Formule de la solution d'Alsever :**

Dextrose anhydre	20,05 gr.
ClNa	8,00 gr.
Citrate trisodique (5 H ² O)	4,20 gr.
Eau distillée	1.000 ml.

Le pH est ajusté à 6,1 avec une solution d'acide citrique 5 %.
Stérilisation trois jours de suite à 100° pendant 30 minutes.

Mélange à volume égal de sang et de solution d'Alsever. On utilise des flacons gradués contenant la solution. On ajoute le sang jusqu'au repère indiquant le volume nécessaire.

On prélève dans ces flacons la quantité de sang nécessaire à chaque réaction. Les manipulations doivent être parfaitement stériles.

La conservation dans ces conditions donne toute satisfaction et on peut utiliser les mêmes flacons pendant trois semaines sans observer une baisse de la sensibilité, une tendance à l'agglutination spontanée ou une hémolyse. On peut ainsi s'adresser aux mêmes animaux, cobaye, mouton, et au même donneur humain pendant plusieurs mois.

c) Préparation de la suspension d'hématies.

Après décantation, les hématies sont lavées trois fois dans la solution tampon de Salk par centrifugation à 3.000 tours pendant 5 minutes. On prépare ensuite une suspension du culot d'hématies à 0,5 % dans cette même solution (Cabasso utilise une suspension à 0,25 % selon la technique Salk). Chaque fois nous avons préparé cette suspension le jour même de son emploi.

Solution de Salk.

(Solution mère à diluer au 1/20 au moment de l'emploi.)

ClNa	170,00 gr.
Monophosphate de Potassium.....	13,60 gr.
Hydroxyde de Sodium	3,00 gr.
Eau distillée sur verre.....	1.000 ml.

Cette dilution au 1/20 donne une solution physiologique de pH 7,1 à 7,2.

Nous avons toujours employé de l'eau bidistillée sur verre en raison de la sensibilité de l'hémagglutination à des traces de cuivre, du moins pour le virus de la grippe (Sautter et Lépine, 1948).

II. — Les suspensions de virus.

Les suspensions de l'hémagglutinine ourlienne après le contrôle de stérilité sont stockées, en ampoules scellées, à 4°. Un volume de 0,3 ml. permet d'obtenir 3 ml. à la dilution 1/10, ce qui permet de titrer l'hémagglutinine avec 5 échantillons d'hématies (en effet, il faut, comme nous le verrons, 0,5 ml. de suspension pour un échantillon d'hématies). Une partie du liquide hémagglutinant est conservée pure, une autre diluée au demi dans de la glycérine.

Au moment du titrage on dilue la suspension de virus, ainsi conservée, au 1/10 pour la suspension pure, au 1/5 pour la suspension glycérinée (dilution finale = 1/10).

III. — Technique du titrage.

Matériel.

Tubes de 80 mm $\times$ 8 à 10 mm à fond parfaitement sphérique. Portoirs en bois et en fer (hémagglutination au B.M. 37°). Rhéomètre réglé à 0,25 ml.

Réaction.

A partir de la solution 1/10 de la suspension de virus, on prépare à l'aide du rhéomètre une galerie de dilution 1/10, 1/20, 1/40... sous un volume de 0,25 ml.

Dans chaque tube on ajoute au rhéomètre 0,25 ml. de la suspension d'hématies à 0,5 %.

Pour chaque suspension d'hématies, on prépare un tube témoin contenant 0,25 ml. de la solution tampon de Salk et 0,25 ml. de suspension d'hématies.

Lecture.

La lecture se fait après une sédimentation de 1 h. 1/2 pour les hématies de poule, 2 heures pour les hématies de cobaye, 2 h. 1/2 pour les hématies d'homme et de mouton.

On doit s'assurer avant la lecture qu'il n'y a aucune agglutination dans le tube témoin. Dans ce tube agglutination O les

hématies sont sédimentées en une pastille à bord nettement limité pour les hématies de poule, en une couronne à bord limité pour les hématies de mouton, cobaye et homme.

On note agglutination 4 une couche tapissant uniformément le fond du tube à bords détachés, agglutination 3 le fond du tube régulièrement tapissé, agglutination 2 un anneau formé par des granulations nettes, agglutination 1 une pastille entourée de granulations nettes, agglutination douteuse un halo de très fines granulations autour d'une pastille.

Dans l'interprétation on ne tient compte que des agglutinations 4, 3, 2.

IV. — Virus standard témoin.

Afin de pouvoir comparer les titres obtenus pour une même suspension lors des titrages successifs on a introduit dans la réaction une suspension de virus grippal, suspension dont le titre hémagglutinant est rigoureusement fixe lorsque les conditions de la réaction sont respectées. On élimine ainsi les erreurs dues aux variations de température et à la qualité des hématies.

Nous avons utilisé la souche Lee 5394, provenant du laboratoire des virus de l'Institut Pasteur de Paris (Dr Lépine), liquide allantoïque récolté après 5 passages au Laboratoire d'Hygiène, additionné de Merthiolate au 1/100.000 et conservé au réfrigérateur à 4° en ampoules scellées.

C) CONSERVATION DE L'HÉMAGGLUTININE OURLIENNE

Depuis les travaux de Beveridge (1946) et Lundbäck (1949), on admettait que l'hémagglutinine ourlienne, contrairement à l'hémagglutinine grippale, se conservait mal.

I. — Action de la glycérine.

L'action antibactérienne de la glycérine était depuis longtemps connue mais c'est à Copeman (1899) que l'on doit son emploi comme agent protecteur, vis-à-vis des bactéries, de tissus infectés

par le virus de la vaccine. Levaditi et Harvier (1920) rapportent que les virus de l'herpès, de la vaccine et de la rage demeurent virulents pendant des mois si on les place dans la glycérine pure ou diluée. Ces recherches furent confirmées par Doerr et ses collaborateurs (1921 et 1922), puis Rivers (1928), qui attribuent cette action à l'inhibition qu'exerce la glycérine sur l'autolyse des tissus infectés par le virus.

Etude de Cabasso et Coll. (1951).

Cabasso a étudié les modalités de conservation de l'hémagglutinine ourlienne et l'action de la glycérine sur cette conservation. Cette étude comprend deux souches adaptées à la cavité allantoïde, la souche Habel à son vingt-cinquième passage, et la souche Enders à son quarante-deuxième passage.

Les liquides, concentrés soit par centrifugation soit par précipitation dans l'alcool, sont titrés par la méthode de Salk (suspension d'hématies de poule à 0,25 %).

Une partie de la suspension de virus est additionnée de glycérine à parties égales, l'autre de solution saline de Eagle ($\text{pH} = 7$). La glycérine utilisée est une glycérine neutre chimiquement pure et elle est ajoutée gravimétriquement. Chacune des préparations est formolée à 0,1 %.

Les deux souches étudiées se comportent différemment quant à la conservation de leur hémagglutinine.

Souche Habel.

La perte du pouvoir hémagglutinant est très rapide pour la préparation en solution saline. Conservée à 37° celle-ci perd son pouvoir hémagglutinant en quelques jours, à 23° en quelques semaines, à + 4° le titre devient très faible à partir de la quatrième semaine.

La glycérine prolonge dans tous les cas la conservation et à + 4° permet d'obtenir le titre initial pendant plus de 15 semaines.

Souche Enders.

Son pouvoir hémagglutinant est beaucoup plus stable. A 37° en solution saline il disparaît en 3 semaines, à 23° en 15 semaines. La glycérine permet de conserver le titre initial pendant plus de 15 semaines à ces températures. A + 4° en solution saline, le titre baisse légèrement au bout de 4 semaines puis se maintient à ce nouveau palier. La glycérine empêche cette légère baisse des premières semaines.

Concentration optima de glycérine.

A 37° pour la souche Habel la conservation augmente avec la concentration en glycérine (jusqu'à 50 %). Pour la souche Enders une concentration de 10 % donne une conservation très appréciable et il n'y a pratiquement pas de différence entre les concentrations 25 et 50 %, avec lesquelles on obtient une conservation intégrale au delà de 16 semaines.

Il est intéressant de noter que Cabasso a pu conserver par cette méthode une suspension de virus ourlien qui a gardé son titre hémagglutinant d'octobre 1949 à octobre 1951. Au Laboratoire d'Hygiène on a pu également conserver plus d'un an une hémagglutinine glycinée provenant du laboratoire de Cabasso.

II. — Autres méthodes de conservation (Sohier et Esser, 1952).

Formulation.

S'inspirant des travaux de Beveridge et Lind (1946), Sohier et Esser (1952, b) ont essayé l'action du formol. Une formulation faible, inférieure à celle indiquée par Beveridge, soit 0,1 à 0,025 %, donne des résultats satisfaisants, mais le même liquide non formolé conservé à + 4° gardait un titre équivalent après 2 mois.

Ces auteurs signalent que la baisse du titre hémagglutinant est d'autant plus rapide que celui-ci est faible et ils ont pu conserver à + 4° pendant plusieurs semaines des liquides donnant avec les hématies de poule des taux de 1/2560 (technique en tubes).

Solution tampon glycolle.

Une solution tampon au glycolle à 0,1 % et 0,1 ‰ avec toute une gamme de pH de 6,3 à 7,9, selon les méthodes proposées par Miller (1931) pour la grippe, a été utilisée. Le pH optimum est situé entre 7 et 7,4.

(Diméthylamino-2' propyl-1') -N-phénothiazine : Phénergan ou 3277 R.P.

En tenant compte des observations faites par Leduc (1950) concernant la conservation des tissus et des hypothèses relatives au mécanisme de ce phénomène attribué par certains à un blocage d'enzymes, Sohier et Esser (1952, b) ont essayé de conserver l'hémagglutinine ourlienne dans une solution de phénergan. Une conservation satisfaisante comparable à celle obtenue avec le tampon glycolle à 0,1 ‰ était constatée avec une concentration finale de phénergan de 1/2000 (on peut rapprocher cette observation des hypothèses de Doerr quant à l'action conservatrice de la glycérine).

III. — Recherches personnelles.

Nous nous sommes proposés d'étudier la conservation de l'hémagglutinine ourlienne de huit souches de virus ourlien et l'action de la glycérine sur cette conservation.

Méthode de conservation.

Dès la récolte, après contrôle de stérilité, chaque liquide hémagglutinant est divisé en deux parties. L'une est conservée pure, l'autre diluée au 1/2 dans la glycérine. Les liquides sont distribués sous un volume de 0,3 ml. pour la suspension pure, de 0,6 ml. pour la suspension glycinée dans des ampoules scellées puis placées au réfrigérateur à $+ 4^{\circ}$. Toutes ces manipulations sont effectuées stérilement.

La glycérine utilisée est de la glycérine neutre (glycérine bidistillée 1,23, produit Merck).

— Résultats.

Chaque liquide viral a été titré à intervalles rapprochés les premières semaines pour déceler une baisse éventuelle du titre hémagglutinant, puis à intervalles plus éloignés. Le pouvoir hémagglutinant a toujours été titré avec quatre variétés d'hématies (poule, mouton, cobaye, homme).

Les résultats sont réunis dans les tableaux ci-contre.

Le titre de la suspension glycinée n'est indiqué (en pointillé et par la lettre G) que lorsque le titre de cette suspension diffère de celui de la suspension pure.

La durée de l'expérimentation a été fonction de la quantité d'hémagglutinine obtenue pour chaque souche et l'expérimentation n'a été suspendue qu'après épuisement du stock des ampoules.

De cette expérimentation portant sur une durée de conservation de 11 semaines (souche LK) à 30 semaines (souche B.O.S.) on peut tirer les conclusions suivantes :

I. — Les suspensions de virus ourlien conservées pures au réfrigérateur à $+ 4^{\circ}$ en ampoules scellées conservent intégralement leur pouvoir hémagglutinant pendant plusieurs mois.

II. — La glycérine est un excellent agent de conservation mais n'est pas indispensable.

III. — Toutes les souches étudiées dans ce travail ont un comportement identique du point de vue de leur conservation. Nous n'avons pas trouvé de différences mêmes esquissées comme celles que Cabasso signale pour les souches Enders et Habel.

N. B. — Si l'on veut comparer ces résultats à l'étude de Cabasso, il faut noter que la suspension non glycinée conservée par celui-ci n'est pas une suspension pure mais une suspension diluée au 1/2 en solution saline de Eagle et que les deux suspensions sont formolées à 0,1 %.

TABLEAU I

Conservation de l'hémagglutinine ourlienne

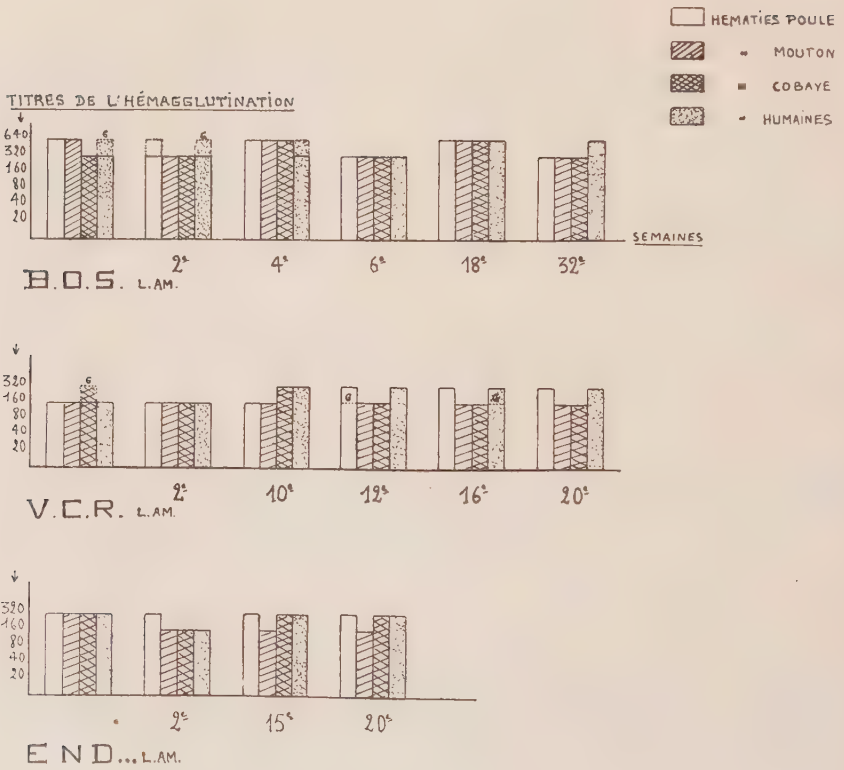
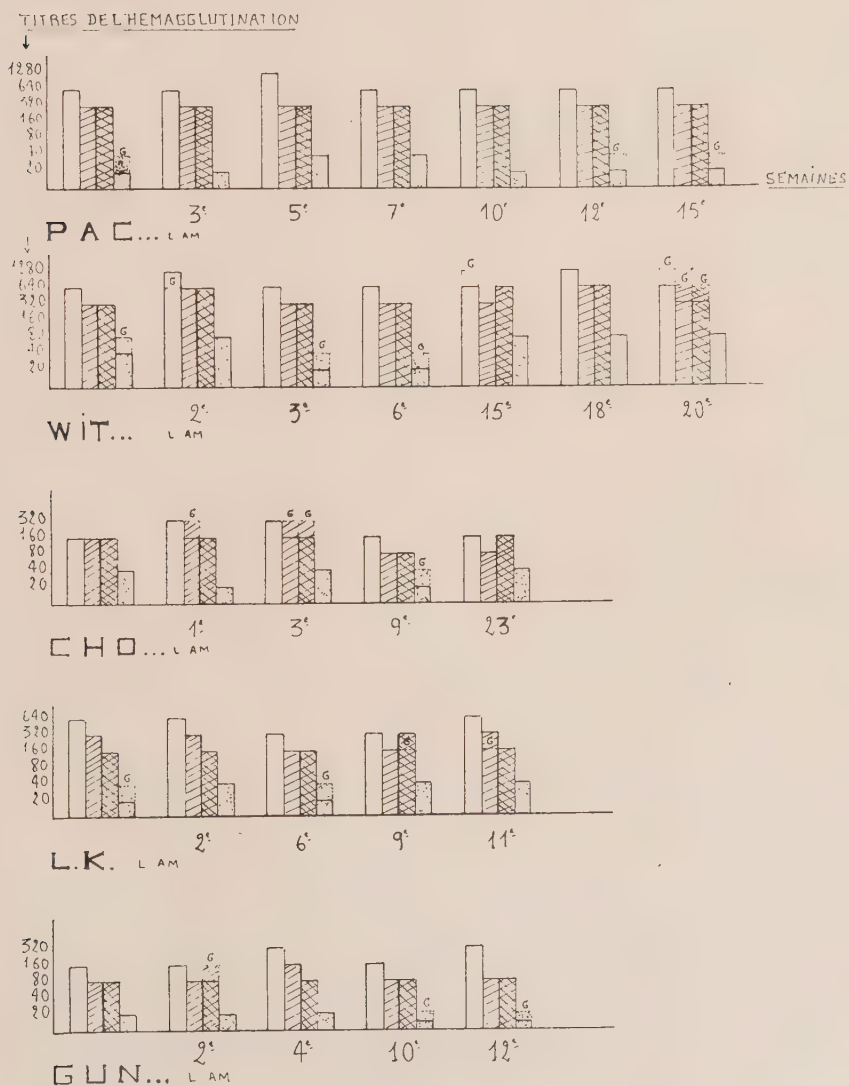


TABLEAU II



CHAPITRE III

L'HÉMAGGLUTININE OURLIENNE : CARACTÈRES

A) PLACE DANS LA CLASSIFICATION DES HÉMAGGLUTININES ET CARACTÈRES DE L'HÉMAGGLUTININE OURLIENNE

CLASSIFICATION DES HÉMAGGLUTININES

Le mécanisme de l'hémagglutination virale n'est pas le même pour tous les virus. On peut, sans excès de schématisation, considérer :

D'une part, les virus dont la propriété hémagglutinante est liée à l'ultra-germe.

D'autre part, ceux pour lesquels elle est représentée par un constituant dissociable du microorganisme infectieux.

Premier groupe :

Propriété hémagglutinante liée au virus lui-même.

On distingue deux sous-groupes selon que le phénomène d'hémagglutination est spontanément réversible ou non.

a) Hémagglutination spontanément réversible.

Lorsque le virus a été absorbé sur les hématies sensibles et provoqué l'agglutination de celles-ci, il peut spontanément se rendre libre à nouveau sans qu'on ait modifié les conditions phy-

sico-chimiques du milieu. Le virus ainsi élué garde toutes ses propriétés dont l'aptitude à hémagglutiner des hématies neuves. Mais les hématies sur lesquelles le virus s'était fixé et qu'il avait agglutinées sont définitivement altérées.

Tout se passe comme si les hématies avaient à leur surface des récepteurs que détruit le virus par un phénomène très vraisemblablement enzymatique et en outre comme si chaque virus avait sur les hématies des récepteurs propres (Burnet et Coll., 1946, Burnet, 1951), encore que ce fait ait été discuté. Ces mêmes récepteurs peuvent d'ailleurs être détruits par des enzymes protéolytiques d'origine microbienne (Burnet et Coll., 1946).

Dans ce groupe figurent les virus de la Grippe, de la maladie de Newcastle et des Oreillons.

b) Hémagglutination non spontanément réversible.

L'ultra-virus ne se fixe sur les hématies et ne provoque leur agglutination que si certaines conditions sont remplies. Ils peuvent, comme les précédents, se rendre libres à nouveau tout en conservant leur pouvoir hémagglutinant mais avec cette différence que les hématies sont encore capables, après avoir été libérées de toute particule de virus, d'en absorber d'autres et de s'agglutiner lorsque les conditions exigibles pour la réalisation de ce phénomène sont remplies.

Deuxième groupe :

Hémagglutinines « solubles ».

L'hémagglutination n'est pas liée au virus lui-même mais elle est due à une substance distincte du virus, prenant naissance dans les milieux où il s'est développé. Elles diffèrent nettement des précédentes et ont les caractères d'une substance phospholipidique. Elles sont détruites par les enzymes agissant sur ces substances tel le venin de cobra ou la toxine du *Clostridium Welchii* (Stone, 1946).

Parmi ces hémagglutinines figurent celles des virus de la Vaccine, de l'Ectromélie et de la Variole aviaire.

CARACTÈRES DE L'HÉMAGGLUTININE OURLIENNE

L'hémagglutinine ourlienne est détruite si l'on porte la suspension virale à 50° pendant 20 minutes. A 37° elle s'altère rapidement et on doit la conserver au réfrigérateur.

L'action de la chaleur, du formol, des rayons ultra-violet, de l'alcool, de la dialyse, des ferments protéolytiques, (Doerr et Hallauer, 1950) est en accord avec une constitution protéique de l'hémagglutinine ourlienne.

L'hémagglutinine ourlienne possède deux propriétés : d'une part elle se fixe sur les hématies (absorption) et en provoque l'hémagglutination, d'autre part elle s'en détache (élution) en inactivant les récepteurs. Dans l'élution (Beveridge et Lind, 1946) on retrouve aussi bien le pouvoir hémagglutinant que le pouvoir fixateur du complément.

En accord avec les expériences de filtration de Habel (1945), Beveridge et Lind (1946) ont montré par centrifugation que l'hémagglutinine ourlienne se déposait tout comme le virus à 15.000 tours.

Ces expériences de filtration, centrifugation, absorption-élution sont essentiellement analogues avec le virus de la grippe et de la maladie de Newcastle, et font penser que l'hémagglutinine est le virus lui-même.

Ces résultats montrent également que la plus grande partie du pouvoir fixateur du complément est le virus lui-même quoique une petite partie de l'antigène peut fixer le complément sans pouvoir provoquer l'hémagglutination. Par chauffage à 56° on détruit l'hémagglutinine sans affecter le pouvoir fixateur du complément, certaines préparations virales pouvant contenir un virus dégénéré capable de fixer le complément sans pouvoir provoquer l'agglutination (Beveridge et Lind, 1946).

B) COMPORTEMENT DE L'HÉMAGGLUTININE OURLIENNE VIS-A-VIS DES HÉMATIES DE DIFFÉRENTES ESPÈCES ANIMALES

Pour un virus donné, il y a une affinité sélective plus ou moins caractéristique pour certaines hématies et le pouvoir agglutinant ne se manifeste que pour les globules rouges de certaines espèces. Dans l'étude de Doerr et Hallauer (1950) on trouve le « spectre d'agglutination » pour chacun des virus provoquant ce phénomène. La plupart des auteurs s'accordent sur le fait que le virus ourlien provoque l'agglutination des hématies de poule, de cobaye, de mouton et d'homme et que l'on peut indifféremment

titrer l'hémagglutinine avec les unes ou les autres de ces hématies.

Etude des souches Enders et Habel : Cabasso et Coll. (1955).

Cabasso a montré le comportement de ces deux souches de virus ourlien. Ces souches qui se distinguent par leur durée de conservation, diffèrent également dans leur pouvoir hémagglutinant vis-à-vis des hématies de poule, d'homme, et de cobaye.

	Poule	Cobaye	Homme (gr. O)
	—	—	—
Souche Enders...	1/640	1/640	1/640
Souche Habel...	1/640	1/320	0

D'autre part, à la température de 37° la souche Habel ne provoque pas l'agglutination des hématies de poule alors que la souche Enders la provoque au même taux qu'à la température du laboratoire.

Travaux personnels.

I. — Hémagglutination de différentes variétés d'hématies.

Par la technique en tube précédemment exposée, nous avons étudié le pouvoir hémagglutinant de différentes souches de virus ourlien pour les hématies de poule, de mouton, de cobaye, d'homme (groupe O). Nous avons mené de front cette étude avec celle de la conservation de l'hémagglutinine et les résultats sont exposés dans les tableaux I et II.

Dans le tableau ci-contre nous mettons en évidence le titre agglutinant de chaque souche pour chacune des hématies, ce titre étant le résultat moyen des différents titrages espacés.

Sans avoir observé un comportement aussi différent que Cabasso pour les souches Enders et Habel vis-à-vis des hématies de poule et d'homme, nous avons cependant noté des différences appréciables entre les souches que nous avons étudiées.

On peut distinguer :

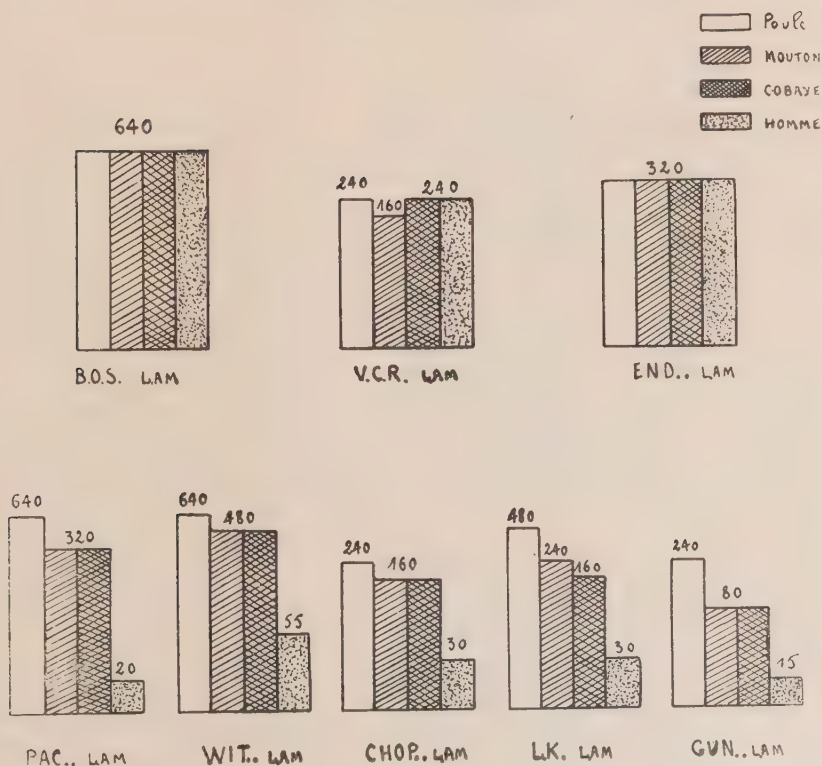
I. — Les souches dont le pouvoir agglutinant ne varie pas avec la variété d'hématies : Souches Enders, B.O.S., V.C.R.

II. — Les souches dont le pouvoir hémagglutinant est faible sinon nul avec les hématies humaines : Souches du type Habel : souches Pachoud, Witzke, Chopin, L.K., Gunst.

Cette différence ne tient pas à la nature des hématies du donneur chez lequel nous avons toujours prélevé nos hématies humaines. En effet, nous avons fait une série de titrages avec 10 variétés d'hématies humaines. Les donneurs Bl..., Bo..., Da..., Gar..., Gav..., Gi..., La..., Re..., Ri..., Ve..., internes ou infirmières âgés de 25 à 30 ans, appartenaient tous au groupe O IV (nous n'avons pas cherché le groupe Rhésus). Les résultats ont été identiques pour chaque échantillon d'hématies.

TABLEAU III

Titre hémagglutinant comparé de 8 virus ourliens
pour 4 variétés d'hématies

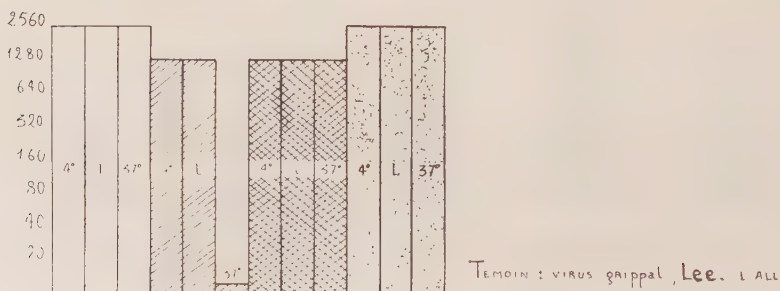
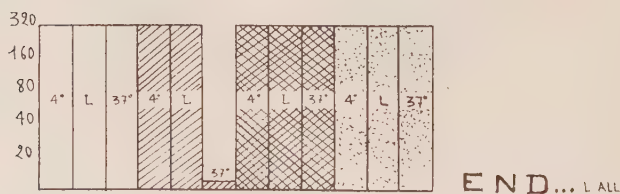
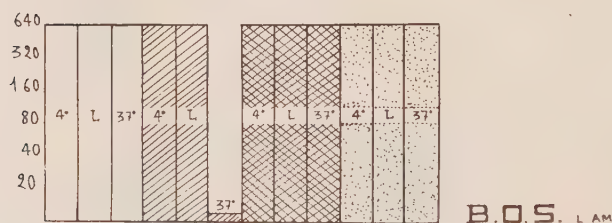
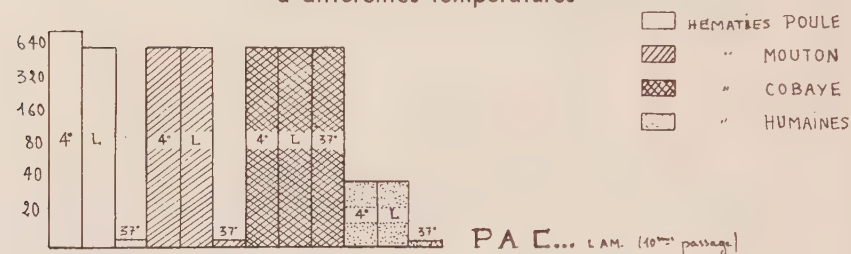


II. — Hémagglutination à différentes températures.

Toutes les expériences précédentes ont été réalisées à la température du laboratoire. Nous avons ensuite étudié le pouvoir hémagglutinant de 3 souches de virus ourlien pour les 4 variétés d'hématies aux températures : 4°, température du laboratoire, 37°.

TABLEAU IV

Titre hémagglutinant comparé de 3 virus ourliens
à différentes températures



Pour chaque virus et pour une variété d'hématies nous avons réalisé une triple répartition puis, dès celle-ci terminée, porté une galerie au bain-marie à 37°, une autre au réfrigérateur à 4°, la troisième demeurant à la température du laboratoire.

Les résultats exposés dans le tableau ci-contre montrent :

I. — A 37° les hématies de mouton ne sont pas agglutinées quel que soit le virus. Même le virus grippal témoin ne provoque pas leur agglutination à cette température.

II. — A 37° la souche Pachoud n'agglutine pas les hématies de poule alors qu'on n'observe pas cette différence avec les souches B.O.S. et Enders.

Cette souche agglutinant très faiblement les hématies humaines, n'agglutinant pas les hématies de poule à 37° possède des caractères très proches de la souche Habel étudiée par Cabasso (1955).

Intérêt pratique.

Pour le diagnostic de l'infection ourlienne par l'épreuve d'hémagglutination il n'est pas indifférent, comme on l'avait proposé jusqu'alors, d'utiliser des hématies de poule, de mouton, de cobaye ou d'homme. En effet, certaines souches ont un pouvoir hémagglutinant très faible voire même nul pour les hématies humaines. L'hémagglutination est sensible à la température pour les hématies de mouton et pour les hématies de poule dans certains cas. Les hématies de cobaye permettent la détection du virus ourlien dans une large échelle de température et sembleraient préférables aux autres variétés. Cependant, on doit leur préférer les hématies de poule qui présentent à la température du laboratoire des avantages certains : sédimentation plus rapide, lecture plus nette, titre agglutinant plus élevé.

Intérêt biologique.

Les différentes souches de virus ourlien isolées jusqu'alors étaient toutes analogues sinon identiques du point de vue de leur structure antigénique ainsi que de leur comportement vis-à-vis des différents agents physiques et chimiques.

Il est intéressant de noter qu'on peut déceler un comportement différent des hémagglutinines provenant de diverses souches de

virus ourlien. Ainsi que le note Cabasso (1955) il est étonnant que cette différence porte sur les hématies humaines alors que le virus est un parasite habituel de l'homme. Ce caractère semble dû à la constitution intrinsèque du virus et non à une évolution au cours des passages, car nous l'avons trouvé pour la souche Pachoud presque dès l'isolement (quatrième passage).

C) INHIBITION DE L'HÉMAGGLUTINATION

I. — Inhibition spécifique.

Un antisérum spécifique inhibe le phénomène d'agglutination des hématies par le virus ourlien comme l'ont observé Levens et Enders (1945). Cette découverte d'une antiagglutinine spécifique mise en évidence dans le sérum de convalescent d'homme, dans le sérum de singe infecté expérimentalement et dans l'antisérum de lapin est à l'origine d'une méthode de diagnostic indirecte : le test d'inhibition de l'hémagglutination du virus ourlien. Les notions sur les conditions techniques de l'épreuve ainsi que sur le délai d'apparition des anticorps qui sont à la base de ce phénomène sont dues à Enders et Coll. (1945, 1946), Beveridge et Lind (1946), Robbins, Kilham et Coll. (1949).

La méthode d'inhibition de l'hémagglutination est utilisée par de nombreux auteurs pour déceler l'infection ourlienne dans ses diverses manifestations chez l'homme. Les résultats des recherches ont été rapportés et commentés par Levens et Enders (1945), Enders et Coll. (1946, 1949), Aikawa et Meiklejohn (1949), Florman et Kutsch (1949), Kilham (1949), Kilham et Coll. (1949), Feller et Jordan (1950), Lundbäck (1949), Cl. Hannoun (1951), Davoli et Signorini (1951), R. Sohier et Esser (1952, b), Gotlieb et Coll. (1953).

II. — Inhibition non spécifique.

En dehors des anticorps inhibant spécifiquement existent de nombreuses substances non spécifiques provoquant le même phénomène.

— Inhibiteurs de l'œuf embryonné.

Beveridge et Lind (1946) signalent la présence d'inhibiteurs non spécifiques dans l'œuf embryonné non infecté, entre le treizième et le seizième jour d'incubation. Ils démontrent ce pouvoir inhibiteur pour le liquide allantoïque et amniotique ainsi que pour le jaune d'œuf et attirent l'attention sur le fait que l'inhibition est d'autant plus marquée que la préparation est plus faible en virus. Le même phénomène a pu être mis en évidence dans des suspensions de membranes chorio-allantoïdiennes et amniotiques de l'œuf infecté (Henle et Coll., 1947).

Le facteur inhibiteur est neutralisé par du virus vivant. Knight (1944), à partir du liquide allantoïque normal, a pu isoler une substance fortement inhibitrice de la fraction de sédimentation S 170-220. Il l'a caractérisée comme « protéine normale » de pH 2,4, d'une viscosité élevée, contenant du glucosamine. Cette protéine augmente en concentration dans l'œuf non infecté entre le septième et le quatorzième jour. Cette même protéine ne peut plus être mise en évidence dans l'œuf infecté à partir du moment où le virus commence sa multiplication.

— Inhibiteurs du sérum normal.

Ce phénomène, observé par Francis (1947) dans les recherches sur la grippe, a été signalé pour le virus ourlien par Beveridge et Lind (1946). Par la suite, deux groupes d'inhibiteurs présents dans le sérum normal ont été décrits :

Un composant thermolabile de nature protidique isolé par Mc Crea (1945) dans la fraction des gamma-globulines.

Un composant, plus thermostable de nature probablement muco-polysaccharidienne (Mc Crea, 1948) qui se rapproche du groupe des inhibiteurs extraits des kystes ovariens (Burnet, 1948), des extraits d'organes, des sécrétions muqueuses, du blanc d'œuf, de l'urine et des extraits d'hématies par différents auteurs.

Il paraît facile de se débarrasser du facteur thermolabile par simple chauffage à 60° pendant 20 minutes, méthode préconisée par Beveridge et Lind (1946) qui ont observé la disparition de l'inhibition non spécifique tout en conservant les propriétés spécifiques du sérum anti-ourlien.

L'inhibiteur thermostable pose un problème plus complexe qui a pu être résolu par les observations de Burnet et Coll. (1942), Anderson (1948), Mc Crea (1948) et Hirst (1948). Les recherches de ces auteurs ont mis en évidence que les substances inhibitrices de nature muco-polysaccharidienne peuvent être neutralisées par contact avec du virus vivant, par un extrait de vibrion cholérique, par un excès de périodate de sodium ainsi que par des ferments protéolytiques (trypsine et chimotrypsine).

Une absorption préalable des sérums à expertiser avec un extrait de vibrion cholérique ou avec le périodate de sodium, dont l'excès est neutralisé par du glucose, diminue le pouvoir inhibiteur non spécifique des sérums normaux comme l'ont signalé certains auteurs (Lundbäck, 1949). Sohler et Esser (1952, b) n'ont pas été gênés par les inhibitions non spécifiques en chauffant à 60° pendant 30 minutes le sérum à expertiser dilué au 1/10 en tampon Salk.

III. — Parallélisme entre inhibition et agglutination.

Tous les auteurs signalent un parallélisme entre le phénomène d'inhibition et d'agglutination. Les inhibiteurs sont considérés comme des récepteurs libres très voisins des récepteurs globulaires avec lesquels ils partagent beaucoup de propriétés : la destruction par du virus vivant surtout, ainsi que la neutralisation par un excès de vibrion cholérique et par le périodate de sodium.

Dans l'inhibition non spécifique il paraît y avoir concours des récepteurs libres avec les récepteurs globulaires et inactivation au moins partielle du virus qui formerait un complexe virus-inhibiteur jusqu'à saturation, ne laissant au phénomène d'hémagglutination lié aux récepteurs globulaires que la quantité de virus restée libre.

On admet qu'il existe un coenzyme pour le système inhibiteur de l'agglutination virale. Florman (1946) a montré pour la souche Enders que l'hémagglutination est fortement inhibée pour les hématies O en présence de liquide allantoïque normal. Il semble que le même phénomène se produise avec le sérum normal qui est plus inhibiteur pour l'hémagglutination avec les hématies humaines qu'avec les hématies de poule. Les hématies humaines apporteraient un coenzyme au complexe virus-inhibiteur.

CHAPITRE IV

ÉTUDE ANTIGÉNIQUE

A) ÉTUDE ANTIGÉNIQUE IN VIVO

Dans le but de comparer leurs propriétés immunisantes, les souches Enders, Pachoud, L.K., B.O.S. ont été inoculées au cobaye. Cette inoculation a été faite par voie nasale selon la technique du Laboratoire d'Hygiène récemment publiée (Sohier et Coll., 1955).

Immunisation du cobaye par voie nasale.

On sait que le cobaye produit des anticorps fixant le complément lorsqu'on lui injecte dans le péritoine ou sous la peau des suspensions de virus ourlien vivant ou inactivé (Cabasso et Coll., 1950) ou qu'on inocule du virus dans la chambre antérieure de l'œil (Bolin et Coll., 1950 et 1952). S'inspirant de la technique de Fulton pour le virus grippal, R. Sohier a utilisé la voie nasale pour immuniser le cobaye contre le virus ourlien. Burr et Nager (1953) ont utilisé cette voie chez le hamster pour l'immunisation contre le virus ourlien.

Méthode.

On pratique une anesthésie aussi complète que possible par inhalation d'éther puis on dépose goutte à goutte sur un seul ori-

fice narinaire du liquide à inoculer. Le liquide doit être aspiré complètement. Il arrive qu'il y ait un léger reflux avec production de bulles; on continue cependant l'instillation après avoir si nécessaire redonné une anesthésie.

Par cette méthode, on a inoculé :

a) Des liquides allantoïques ou amniotiques infectés par les souches B.O.S., Enders, Pachoud et L.K.

b) Une salive infectée : salive du malade Pachoud, salive à partir de laquelle a été isolée par la culture sur l'œuf embryonné la souche Pachoud.

c) Une salive et des liquides normaux.

Titration des anticorps.

Les anticorps élaborés ont été titrés par la réaction de fixation du complément, technique décrite par Sohier et Esser (1952) mais modifiée quant aux volumes pour réaliser non plus une semi-micro-méthode, mais une micro-méthode.

Résultats obtenus.

Dans tous les cas les sérums des cobayes, inoculés par cette méthode avec les souches B.O.S., Enders, L.K., et Pachoud, contenaient des anticorps fixant le complément à un titre élevé (Sohier et Coll., 1955, Sohier et Coll., publication à paraître).

B) ÉPREUVE DE NEUTRALISATION SUR ŒUF

Cette épreuve consiste à faire agir sur des quantités constantes d'un virus connu des dilutions croissantes d'un sérum neutralisant ou supposé tel.

Diverses méthodes ont été proposées : méthode de Enders et Coll. (1948), méthode de la « section des Virus et Rickettsies » des Laboratoires Lederle utilisée par Hoyt (1951).

Celle que nous avons employée sera décrite plus loin, elle est très voisine de celle de Enders.

On inocule le mélange virus-sérum neutralisant à l'œuf embryonné. La neutralisation est appréciée par le développement ou non du virus, jugé par son pouvoir hémagglutinant.

Le pouvoir neutralisant de sérums de cobayes préparés contre les souches Enders, L.K. et Pachoud, a été étudié vis-à-vis d'un liquide allantoïque infecté par la souche Enders.

I. — Préparation des sérums anti.

Les sérums ont été préparés par inoculation par voie nasale chez le cobaye des trois souches de virus ourlien.

Sérum anti-L.K.

Les cobayes 367 et 368 ont reçu par voie nasale 0,9 ml. d'un liquide amniotique frais infecté par la souche L.K. (titre hémagglutinant 1/80 pour les hématies de poule) puis une injection de rappel le sixième jour par voie intradermique, 4 papules de 0,25 ml. d'un liquide amniotique frais hémagglutinant au 1/40.

Les sérums prélevés le douzième jour après la première inoculation fixaient le complément respectivement au 1/64 et 1/128.

Sérum anti-Pachoud.

Les cobayes 365 et 366 ont reçu par voie nasale 1 ml. de liquide amniotique frais infecté par la souche Pachoud (titre hémagglutinant 1/80 pour le cobaye 365 et 1/320 pour le cobaye 366) puis une injection de rappel intradermique le sixième jour, 4 papules de 0,3 ml. d'un liquide hémagglutinant 1/640.

Les sérums prélevés le douzième jour fixaient le complément à 1/128.

Sérum anti-Enders.

Les cobayes 363 et 364 ont reçu par voie nasale 1 ml. de liquide allantoïque dilué au demi, infecté par la souche Enders, congelé à -20° pendant 40 jours (titre hémagglutinant—1/640).

Les sérums prélevés au douzième jour fixaient le complément à 1/256.

Tous les sérums ont été gardés à 4° pendant 48 heures en attendant leur utilisation dans l'épreuve de neutralisation.

II. — Titrage du liquide viral.

Le liquide utilisé pour cette épreuve de neutralisation est un liquide allantoïque, infecté par la souche Enders, dont le titre héماغгlutinant est 1 / 1280 pour les hématies de poule. Ce liquide a été conservé en ampoules lyophilisées.

Détermination de la DL. 50.

Principe.

Il est essentiel qu'une même dose de virus, clairement définie, soit employée pour chacune des inoculations d'un bout à l'autre de l'expérience. Il est donc nécessaire de disposer d'un virus préalablement titré et dont le pouvoir infectant ne subisse pas de modifications au cours de la recherche. On sait que la région du titrage la moins affectée par les variations statistiques et les erreurs systématiques d'expérience est celle où la moitié des œufs est infectée. On désigne par convention par le signe DL. 50 le titre pour lequel 50 % des œufs sont infectés.

On emploie la méthode de Reed et Muench (1938) qui repose sur les principes suivants :

I. — Chaque groupe considéré (œufs inoculés) doit comporter au moins 5 individus.

II. — La dilution critique (taux 50 %) doit être encadrée par au moins deux dilutions supérieures et deux dilutions inférieures.

III. — Les résultats sont additionnés par la méthode des totaux cumulatifs consistant à additionner pour chaque dilution tous les œufs ayant été infectés, comptés à partir du taux le moins concentré (puisqu'ils auraient été infectés à des dilutions moins élevées) et tous les œufs non infectés à partir du taux le plus concentré (puisqu'ils auraient résisté à des dilutions plus grandes).

Technique.

La technique d'inoculation est celle décrite au chapitre I. Les dilutions sont faites en bouillon ordinaire et on ajoute 1.000 unités de Pénicilline et 100 gamma de Streptomycine par ml. On inocule 0,2 ml. par voie allantoïque (la souche Enders est adaptée à cette

cavité) à des œufs incubés de 7 jours et on récolte les liquides après une seconde incubation de 5 à 6 jours.

Pour chaque dilution on inocule 8 œufs. On change de seringue, d'aiguille et de pipette pour chaque dilution.

L'infection est jugée par l'hémagglutination (technique en gouttes décrite au chapitre I). On considère les œufs morts avant le troisième jour d'incubation comme non inoculés.

Résultats.

Dans le tableau ci-dessous, nous résumons les résultats et donnons un exemple de calcul de la DL. 50.

Dilutions du virus	Nbre d'œufs inoculés	Hg		Totaux cumulatifs		Hg %
		+	= 0	+	= 0	
10^{-2}	12	7	5	16	5	76
10^{-3}	6	3	3	9	8	52,9
10^{-4}	7	4	3	6	2	35,3
10^{-5}	6	1	5	2	16	2
10^{-6}	8	1	7	1	23	4

Hg + : Nombre d'œufs infectés (hémagglutination +).

Hg = 0 : Nombre d'œufs non infectés (hémagglutination = 0).

Hg % : Pourcentage d'œufs infectés.

La dilution correspondant à la DL. 50 est donc située entre les dilutions 10^{-4} et 10^{-3} . On pourrait la déterminer expérimentalement avec des dilutions échelonnées entre 10^{-4} et 10^{-3} . Plus simplement on calcule par la méthode suivante la fraction à ajouter à l'exposant logarithmique (distance proportionnelle) du titre le plus bas.

Mortalité immédiatement supérieure à 50 % - 50
Mortalité immédiatement sup. à 50 % - mortalité immédiatement inf. à 50 %

$$\text{Soit dans l'exemple précédent } \frac{52,9 - 50}{52,9 - 35,3} = 0,16.$$

La DL. 50 est donc $10^{-3,16} = 1/1466$.

Pour plus de sûreté nous avons répété ce calcul et pris la moyenne, soit une DL. 50 = 10^{-3} .

III. — Epreuve de neutralisation.

Dans une première épreuve des doses de 10 DL. 50 et 25 DL. 50 n'ont produit aucune infection des œufs inoculés. Dans l'épreuve suivante la dose infectante est de 50 DL. 50.

L'inoculat est constitué d'un mélange à parties égales, de liquide viral et de sérum anti. Le liquide viral est dilué au 1/10, ce qui correspond à une dilution finale de 1/20, soit 50 DL. 50. Les sérums sont testés aux dilutions 1/2, 1/4, etc., après avoir été préalablement inactivés pendant 30 minutes à 56°. Le mélange virus-sérum est mis à 37° pendant une heure puis dans la glace pendant la durée de l'inoculation. On prépare également deux inoculats témoins, l'un virus + bouillon ordinaire, l'autre virus + sérum de cobaye normal. Pour éviter toute cause d'erreur on change de pipette et de seringue à chaque sérum, d'aiguille à chaque dilution de sérum.

L'inoculation et la récolte se font selon les méthodes précédemment décrites. L'infection est jugée par le pouvoir hémagglutinant (technique en gouttes).

IV. — Résultats.

Les résultats sont réunis dans le tableau ci-dessous. Le premier chiffre de la fraction indique le nombre d'œufs infectés, le second chiffre le nombre d'œufs inoculés. (Les œufs morts avant le troisième jour d'incubation étant considérés comme non inoculés.)

		Dilutions des sérums	pur	1/2	1/4	1/8	1/12	1/16
		—	—	—	—	—	—	—
Virus Enders	+ Sérum anti-Enders.....	—	0/6	0/6	2/6	2/6	4/6	
	+ Sérum anti-Pachoud....	0/6	2/6	5/6	—	—	—	
	+ Sérum anti-L.K.	2/3	4/6	5/6	—	—	—	
	+ Sérum cobaye normal..	4/5	6/6	—	—	—	—	
	+ Bouillon ordinaire.....	4/6	—	—	—	—	—	

Le sérum anti-L.K. même pur ne neutralise pas le virus Enders; le sérum anti-Pachoud neutralise à la dilution 1/2 alors que le

sérum anti-Enders neutralise encore à la dilution 1/12 le virus Enders.

Cette première investigation fait apparaître une différence nette sur le plan immunologique entre les trois souches et précisément entre celles qui diffèrent quant à leurs propriétés hémagglutinantes. Il restera à vérifier si les souches qui ont des hémagglutinines possédant les mêmes caractères que la souche Enders se comportent comme celle-ci sur le plan immunologique.

Il conviendra de rechercher si les différences tiennent aux caractères antigéniques des souches ou aux conditions dans lesquelles l'immunisation du cobaye a été réalisée.

CONCLUSIONS

I. — Après avoir rappelé la méthode d'isolement du virus ourlien par inoculation à l'œuf embryonné de salive ou de L.C.R. d'oreillards et décrit les conditions d'isolement de 5 souches de virus ourlien au Laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine de Lyon,

II. — Nous avons précisé les conditions d'obtention et les procédés de titrage de l'hémagglutinine ourlienne.

III. — Le problème de la conservation de l'hémagglutinine ourlienne, que d'aucuns considéraient comme courte alors que d'autres (Cabasso) variable selon les souches, a particulièrement retenu notre attention. Nous avons étudié comparativement la conservation de l'hémagglutinine pure et de l'hémagglutinine glycérinée. Dans les deux cas, pour des durées allant de plusieurs semaines à plusieurs mois, nous n'avons pas observé de baisse du titre initial.

IV. — L'hémagglutinine ourlienne, que nous avons étudiée, trouve place dans le groupe des hémagglutinines liées au virus lui-même et dont l'hémagglutination est spontanément réversible. Ses principaux caractères ont été rappelés.

V. — Nous avons ensuite comparé le titre hémagglutinant de 8 souches de virus ourlien vis-à-vis de 4 variétés d'hématies: poule, mouton, cobaye, homme. Sans trouver des différences aussi grandes que Cabasso pour les souches Enders et Habel, nous avons pu distinguer deux groupes: le premier comprenant les souches dont l'hémagglutination est au même taux pour les quatre variétés d'hématies, le second comprenant les souches dont l'hémagglutination est très faible avec les hématies humaines.

VI. — A 37°, l'une des souches que nous avons étudiées n'agglutine pas les hématies de poule. A cette température, les hématies de mouton ne sont pas agglutinées quel que soit le virus.

VII. — Nous avons étudié l'immunisation du cobaye par voie nasale pour différentes souches de virus ourlien. Toutes ont provoqué l'élaboration d'anticorps.

VIII. — Par l'épreuve de neutralisation sur œuf nous avons tenté de déceler des différences dans les propriétés antigéniques des souches et en particulier s'il y a un rapport entre leurs caractères immunologiques et leurs propriétés hémagglutinantes.

Le Doyen,
H. HERMANN.

Le Président de la Thèse,
R. SOHIER.

Vu et permis d'imprimer :
Lyon, le 28 Octobre 1955.

Le Recteur, Président du Conseil de l'Université,
André ALLIX.

BIBLIOGRAPHIE

- AIKAWA J. et MEIKLEJOHN G. — Serologic diagnosis of mumps. *J. Immunol.*, 1949, **62**, 261-269.
- ANDERSON S.G. — Mucins and mucoids in relation to influenza virus action. *Austr. J. exp. Biol. a. Med. Sci.*, 1948, **26**, 347-354.
- BEVERIDGE W.I.B., LIND P.E. et ANDERSON S.G. — Mumps; isolation and cultivation of virus in chick embryo. *Austr. J. exp. Biol. a. Med. Sci.*, 1946, **24**, 15-19.
- BEVERIDGE W.I.B. et LIND P.E. — Mumps; virus haemagglutination and serological reactions. *Austr. J. exp. Biol. a. Med. Sci.*, 1946, **24**, 127-132.
- BOLIN V.S., ANDERSON S.G. et LEYMASTER G.R. — Experimental intraocular infection of guinea pigs with mumps virus. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1950, **75**, 166-170.
- BOLIN V.S. et LEYMASTER G.R. — Use of guinea pigs eye in study of intraocular infections produced by mumps virus. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1952, **79**, 7-12.
- BONNEL P.H. — Le contrôle bactériologique des produits biologiques au moyen d'un milieu permettant la culture à l'air libre des germes aérobies et anaérobies. *Ann. Inst. Pasteur Paris*, 1950, **79**, 422-428.
- BURNET F.M. et STONE J.D. — Haemagglutinins of vaccina and ectromelia viruses. *Austr. J. exp. Biol. a. Med. Sci.*, 1946, **24**, 1-8.
- BURNET F.M., Mc CREA J.F. et STONE J.D. — Modification of red cells by virus action. *Brit. J. exp. Path.*, 1946, **27**, 228-236.
- BURNET F.M. — Modification of human red cells by virus action. *Brit. J. exp. Path.*, 1946, **27**, 244-247.
- BURNET F.M., Mc CREA J.F. et ANDERSON S.G. — Mucin as substrate of enzyme action by viruses of mumps influenza group. *Nature*, 1947, **160**, 404.
- BURNET F.M. — Mucins and mucoids in relation to influenza virus action, inhibition of virus haemagglutination by glandular mucins. *Austr. J. exp. Biol. a. Med. Sci.*, 1948, **26**, 371-379.

- Interaction of virus and cell surface. Proc. Roy. Soc. Ser. London, 1951, **138**, 47-64.
- CABASSO V.S., RUESSEGER J.M., LOOSER G.K. et COX H.R. — Immunologie response of children to injection of chick embryo propagated mumps virus vaccine, as measured by complement fixation test. J. Lab. a. Clin. Med., 1950, **35**, 771-779.
- CABASSO V.S., MARKHAM F.S. et COX H.R. — Stabilizing action of glycerine on haemagglutination of Egg-adapted mumps. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1951, **78**, 791-796.
- CABASSO V.S. et COX H.R. — Haemagglutination behavior of mumps virus strains of different origin. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1955, **88**, 370-372.
- COPEMAN S.M. — Vaccination. London, Mc Milland and Co., Ltd, 1899, 153-188.
- DAVOLI R. et SIGNORINI L.F. — Ricerche eziologiche e sierologiche sulla parotite epidemica. Boll. Ist. Sieroterap. Milanese, 1951, **30**, 404-414.
- DOERR R. et SCHNABEL A. — Das virus des Herpes febrilis und seine Beziehungen zum virus der Encephalitis epidemica. Z. f. Hyg., 1921, **94**, 29-81.
- DOERR R. et BERGER W. — Die Beziehungen der Encephalitis epidemica zum Herpes febrilis und zur influenza. Sch. Med. Woch., 1922, **52**, 862-866.
- DOERR R. et HALLAUER C. — In Handbuch der Virusforschung; II Ergänzungsband. Springer, verlag, Wien, 1950, 141-220.
- EAGLE H. — The laboratory diagnosis of syphilis. St Louis, 1937, The C.V. Mosby Co., 149.
- ENDERS J.F., KANE C.W., COHEN S. et LEVENS J.H. — Immunity in mumps. J. exp. Med., 1945, **81**, 93.
- ENDERS J.F., LEVENS J.H., STOKES J., MARIS E.P. et BERENBERG W. — Attenuation of virulence with retention of antigenicity of mumps virus after passage in embryonated egg. J. Immunologie, 1946, **54**, 283-291.
- ENDERS J.F. et LEVENS J.H. — In Diagnosis procedures for viral and rickettsial diseases. Amer. Publ. Health. Assoc., édit., New-York, 1948, 139.
- ESSER-TRIMBERGER I. — Diagnostic de l'infection ourlienne par les méthodes biologiques spécifiques. Thèse, Lyon, 1952, Imprimerie des Beaux-Arts, Lyon.
- FELLER A.E. et JORDAN W.S. — Serologic studies of mumps employing complement fixation and agglutination-inhibition. J. lab; a. clin. Med., 1950, **36**, 360-368.
- FLORMAN A.L. et KUTSCH J.H. — Specific serological reactions which follow naturally acquired mumps. J. Immunol., 1949, **63**, 281-289.

- GOTLIEB T., BASHE W.S., HENLE G. et HENLE W. — Studies on the prevention of mumps. The development of a neutralization test and its application to convalescent sera. *J. Immunol.*, 1953, **71**, 76-85.
- HABEL K. — Cultivation of mumps virus in developing chick embryo. *Pub. Health. Rep.*, 1945, **60**, 201-212.
- HANNOUN Cl. — Isolement et étude de trois souches de virus des oreillons. *Ann. Inst. Pasteur Paris*, 1951, **80**, 175.
- HENLE G., HENLE W. et HARRIS S. — Serological differentiation of mumps complement-fixation antigens. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1947, **64**, 290-295.
- HENLE G., HENLE W., WINDELL K. et ROSENBERG P. — Isolation of mumps virus from human beings with induced apparent or inapparent infections. *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 223-232.
- HIRST G.K. — Quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination. *J. exp. Med.*, 1942, **75**, 49-64.
- Nature of virus receptors of red cells. *J. exp. Med.*, 1948, **87**, 301.
- HIMMELWEIT F. — Rapid assessment of virus haemagglutination by aid of centrifugal and centripetal effects. *Nature*, 1949, **164**, 650-651.
- HOYT A., EBY T.M., ASHTON P. et VELDEE M.V. — Antibody response to mumps vaccine as evaluate by complement fixation and serum-virus neutralization tests. *J. Immunol.*, 1951, **66**, 317-322.
- KILHAM L. — Mumps meningoencephalitis with and without parotidis. *J. of Dis. of Children*, 1949, **78**, 324-333.
- KNIGHT C.A. — Sedimentable component of allantoic fluid and its relations to influenza viruses. *J. exp. Med.*, 1944, **80**, 83-100.
- LEDUC J.R. — Nouveaux développements dans l'étude de quelques anti-histaminiques. *C. R. Soc. Biol.*, 1950, **144**, 190.
- LÉPINE P. et SOHIER R. — Techniques de laboratoire appliquées au diagnostic des infections à virus. Masson, éditeur, 1954.
- LEVADITI C. et HARVIER P. — Le virus de l'encéphalite léthargique. *C. R. Soc. Biol.*, 1920, **83**, 354.
- LEVENS J.H. et ENDERS J.F. — Hemoagglutinative properties of amniotic fluid from embryonated eggs infected with and without penicillin. *Science*, 1945, **102**, 117-120.
- LEYMASTER G.R. et WARD T.G. — Direct isolation of mumps virus in chick embryos. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1947, **65**, 346-348.
- LUNDBÄCK H. — Serological diagnosis in mumps. *Brit. J. exp. Path.*, 1949, **30**, 221-231.
- Mc CREA J.F. — Non specific serum inhibition of influenza haemagglutination. *Austr. J. exp. Biol.*, 1946, **24**, 238-291.
- Mucins and mucoids in relation to influenza virus action. *Austr. J. exp. Biol.*, 1948, **26**, 355-370.

- MILLER M.K. — Four types of encephalitis; mumps meningoencephalitis... J. Amer. Med. Assoc., 1931, **97**, 161-164.
- REEDS L.S. et MUENCH H. — Simple methode of estimating 50 per cent endpoints. Amer. J. Hyg., 1938, **27**, 493-497.
- RIVERS T.M. — Filterable viruses. Amer. J. Path., 1928, **4**, 91-124.
- ROBBINS F.C., KILHAM L., LEVENS J.H. et ENDERS J.F. — An evaluation of the test for antihemagglutinine in the diagnosis of infections by the mumps virus. J. Immunol., 1949, **61**, 235-242.
- SALK J.E. — Simplified procedure for titrating haemagglutinating capacity of influenza virus and corresponding antibody. J. Immunol., 1944, **49**, 87-98.
- SAUTTER V. et LÉPINE P. — Etude des causes d'erreurs dans les réactions d'hémagglutination : rôle du cuivre. Ann. Inst. Pasteur Paris, 1948, **74**, 261-270.
- SOHIER R. et NABONNE A. — Procédé simple et rapide de prélèvement de salive parotidienne des malades atteints d'oreillons. C. R. Soc. Biol., 1939, **131**, 881.
- SOHIER R. et ESSER-TRIMBERGER I. (a). — Recherches sur le diagnostic sérologique des oreillons ; réaction de fixation du complément. Ann. Inst. Pasteur Paris, 1952, **82**, 168-185.
- SOHIER R. et ESSER-TRIMBERGER (b). — Recherches sur le diagnostic sérologique des oreillons ; réaction d'inhibition de l'hémagglutination. Ann. Inst. Pasteur Paris, 1952, **82**, 696-712.
- SOHIER R., CHALLUT F. et CHARDONNET Y. — Immunisation du cobaye par voie nasale contre le virus des oreillons. Ann. Inst. Pasteur Paris, 1955, **88**, 113.
- STONE J.D. — Inactivation of vaccinia and ectromelia virus haemagglutinins by lecithinase. Austr. J. exp. Biol. a. Med. Sci., 1946, **24**, 191-196.
- VIEUCHANGE J., REINIE L. et SAUTTER V. — Influence de la dilution du matériel d'inoculation sur la multiplication des virus grippaux dans l'œuf de poule incubé. C. R. Soc. Biol., 1946, **140**, 969.
- WEIL M.L., BEARD D. et BEARD J.W. — pH stability, response to antibiotics and factors influencing egg-culture of mumps virus. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1948, **68**, 308-309.
- WOLFF H.L. — Ned. Tijdschrift voor Geneeskunde, 1950, **2**, 1112.
-

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	13
CHAPITRE PREMIER. — Isolement du virus ourlien. Les souches étudiées	17
A) Les souches provenant de différents laboratoires	17
B) Les souches isolées au Laboratoire d'Hygiène	18
Méthode d'isolement	18
Les souches isolées	23
CHAPITRE II. — L'hémagglutinine ourlienne : titrage et conservation.	25
A) L'hémagglutinine ourlienne	25
B) Techniques de titrage de l'hémagglutinine ourlienne	27
C) Conservation de l'hémagglutinine ourlienne	31
CHAPITRE III. — L'hémagglutinine ourlienne : caractères	39
A) Place dans la classification des hémagglutinines et caractères de l'hémagglutinine ourlienne	39
Classification des hémagglutinines	39
Caractères de l'hémagglutinine ourlienne	40
B) Comportement de l'hémagglutinine ourlienne vis-à-vis des hématies de différentes espèces animales	41
C) Inhibition de l'hémagglutination	46
CHAPITRE IV. — Etude antigénique	49
A) Etude antigénique in vivo	49
B) Epreuve de neutralisation sur œuf	50
CONCLUSIONS	57
BIBLIOGRAPHIE	59
